

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 03 May 2001 (03.05.01)	
International application No. PCT/EP00/07206	Applicant's or agent's file reference PCT 1213-065
International filing date (day/month/year) 26 July 2000 (26.07.00)	Priority date (day/month/year) 26 July 1999 (26.07.99)
Applicant KAHL, Johan-Valentin et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
 23 February 2001 (23.02.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Claudio Borton Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
IM GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts PCT 1213-065	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 00/ 07206	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 26/07/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 26/07/1999
Anmelder KAHL, Johan-Valentin		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 23 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ **Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen** (siehe Feld I).

3. ☐ **Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung** (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 1

☒ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ keine der Abb.

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.



A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 G01N27/447

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehorende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	US 5 427 663 A (AUSTIN ROBERT H ET AL) 27. Juni 1995 (1995-06-27) Spalte 9, Zeile 18 - Spalte 10, Zeile 51; Abbildungen 2,3 ---	1, 21, 29, 35
Y	EP 0 396 053 A (ISCO INC) 7. November 1990 (1990-11-07) Seite 8, Zeile 9 - Zeile 28; Abbildung 1 ---	1, 21, 29, 35
A	WO 96 42012 A (MARUZZO BRUNO ; STEVENS JOHN K (CA); WATERHOUSE PAUL (CA); YAGER TH) 27. Dezember 1996 (1996-12-27) Zusammenfassung; Abbildungen 1A-1C ---	1
A	US 5 630 924 A (NASHABEH WASSIM A ET AL) 20. Mai 1997 (1997-05-20) Spalte 21, Zeile 45 - Zeile 48 ---	2
	--- -/-	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

31. Januar 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

06/02/2001

 Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P B 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Duchatellier, M



C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESCHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 5 066 382 A (WEINBERGER SCOT R ET AL) 19. November 1991 (1991-11-19) Spalte 12, Zeile 38 - Zeile 51 ---	2-4
A	US 5 059 294 A (LIZARDI PAUL M) 22. Oktober 1991 (1991-10-22) Spalte 9, Zeile 39 - Zeile 58; Abbildungen 2,3 ---	7,8
A	US 5 423 966 A (WIKTOROWICZ JOHN) 13. Juni 1995 (1995-06-13) Zusammenfassung ---	14,15
A	WO 96 23213 A (MURRAY ANTHONY J ;STEGEMANN JOSEF (DE); ANSORGE WILHELM (DE)) 1. August 1996 (1996-08-01) Zusammenfassung ---	16
A	US 5 846 394 A (SMOLENSKY LEO A ET AL) 8. Dezember 1998 (1998-12-08) Zusammenfassung -----	1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

EP 00/07206

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5427663	A	27-06-1995	CA 2164720 A EP 0711412 A JP 9504362 T WO 9429707 A US 5837115 A	22-12-1994 15-05-1996 28-04-1997 22-12-1994 17-11-1998
EP 0396053	A	07-11-1990	US 5135628 A US 5336383 A CA 2016107 A JP 3041356 A	04-08-1992 09-08-1994 05-11-1990 21-02-1991
WO 9642012	A	27-12-1996	AU 698921 B AU 6271896 A AU 702083 B AU 6274696 A CA 2222628 A CA 2226405 A EP 0830594 A EP 0830595 A JP 11508042 T WO 9642013 A US 6110339 A	12-11-1998 09-01-1997 11-02-1999 09-01-1997 27-12-1996 27-12-1996 25-03-1998 25-03-1998 13-07-1999 27-12-1996 29-08-2000
US 5630924	A	20-05-1997	EP 0821791 A JP 3035357 B JP 10512371 T WO 9633412 A US 5948231 A	04-02-1998 24-04-2000 24-11-1998 24-10-1996 07-09-1999
US 5066382	A	19-11-1991	NONE	
US 5059294	A	22-10-1991	NONE	
US 5423966	A	13-06-1995	AT 181156 T AU 694657 B AU 5615596 A CA 2181136 A DE 69510185 D DE 69510185 T EP 0746763 A JP 9508211 T WO 9520156 A US 5593559 A	15-06-1999 23-07-1998 15-01-1998 27-07-1995 15-07-1999 02-12-1999 11-12-1996 19-08-1997 27-07-1995 14-01-1997
WO 9623213	A	01-08-1996	EP 0805974 A JP 10513553 T	12-11-1997 22-12-1998
US 5846394	A	08-12-1998	NONE	



VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

RECEIVED 08 NOV 2001



PCT

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts PCT1213-06556/JS	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/07206	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 26/07/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 26/07/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK B01D57/00		
Anmelder KAHL, Johan-Valentin		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 7 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).
Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 23/02/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 06.11.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Jochheim, J Tel. Nr. +49 89 2399 8632 



I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-20 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-46 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1/3-3/3 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:



- ☐ Beschreibung, Seiten:
☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-20, 23-28, 30, 33, 34, 42-46
	Nein: Ansprüche	21, 22, 29, 31, 32, 35-41
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	2, 3, 7, 8, 12, 14, 15, 18-20, 30, 33, 42, 45
	Nein: Ansprüche	1, 4-6, 9-11, 13, 16, 17, 21-29, 31, 32, 34-41, 43, 44, 46
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	Ja: 1-46
	Nein: Ansprüche	

**2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt**

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:
siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt



Vorbehaltlich der Möglichkeit auf zusätzliche Dokumente im Verlauf des Verfahrens Bezug zu nehmen, wird auf die folgenden Dokumente des internationalen Rechercheberichtes verwiesen:

- D1:** US-A-5 427 663 (AUSTIN ROBERT H ET AL) 27. Juni 1995 (1995-06-27)
D3: WO 96 42012 A (MARUZZO BRUNO ;STEVENS JOHN K (CA); WATERHOUSE PAUL (CA); YAGER TH) 27. Dezember 1996 (1996-12-27)

ferner, als neues Dokument durch den Bediensteten angeführt:

- D10:** OUDENAARDEN, BOXER: 'Brownian Ratchets: Molecular separation in lipid bilayers supported on patterned arrays', SCIENCE, 13. August 1999, Band 285, Seiten 1046 - 1048. **Bemerkung:** Dieser Artikel wurde dem Journal am 26. März 1999 zu Verfügung gestellt, mit anderen Worten vor dem Prioritätsdatum der vorliegenden Anmeldung.

Folgende Abkürzungen werden innerhalb dieses Bescheides verwendet: Seite (s), Spalte (sp), Zeile (z), Beispiel (bsp), Anspruch (a).

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach **Artikel 35(2) PCT** hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1.1 Der unabhängige Anspruch 1 erfüllt die Anforderungen von Artikel 33(2) PCT bezüglich Neuheit, da:

D1 nicht offenbart, die (durch Elektrophorese zu trennenden) Partikel auf eine substratgestützte Membran aufzubringen, entlang deren Oberfläche die Partikel beweglich sind,

D3 ebenfalls keine substratgestützte Membran offenbart,

D10 zwar auf die Nutzbarkeit von substratgestützten Membranen aus Lipid-Doppelschichten zur Trennung von Gemischen, deren Moleküle auf der Oberfläche der Membran assoziiert sind (sp 1 auf s 1048, 2. Absatz), und an



gleicher Stelle auf eine Anwendung in der Elektrophorese von zwei Lipiden verweist (siehe Punkt 1.2), jedoch die Durchführung der Elektrophorese nicht genauer beschrieben ist.

- 1.2 Der unabhängige **Anspruch 1** erfüllt nicht die Anforderungen von Artikel 33(3) PCT bezüglich erfinderischer Tätigkeit und zwar aus folgenden Gründen:

Das Dokument **D1** wird als nächstliegender Stand der Technik gegenüber dem Gegenstand des **Anspruchs 1** angesehen. Es offenbart (die Verweise in Klammern beziehen sich auf dieses Dokument):

Ein Verfahren zur elektrophoretischen Trennung von Partikeln (sp 1, z 9-11), insbesondere von Makromolekülen (a 63), mit den Schritten : Einbringen der zu trennenden Partikel in ein fluides Medium und anschließende Überführung des Mediums mit den darin enthaltenen Partikeln in eine Elektrophoresekammer (a 63), Vorsehen eines elektrischen Feldes derart, dass die Feldrichtung entlang der Oberfläche, entlang der die Partikel beweglich sind, ausgerichtet ist (sp 10, z 21-51), wobei auf die Partikel eine Kraft wirkt, die zu einer Bewegung der Partikel führt (sp 10, z 25-26). **D1** beschreibt ferner die Möglichkeit, eine Wechselspannung anstatt einer Gleichspannung zu verwenden (sp 10, z 48-51).

Der Gegenstand des **Anspruchs 1** unterscheidet sich von diesem bekannten Verfahren **dadurch**, daß

- a) die Partikel auf eine **substratgestützte Membran**, entlang deren Oberfläche die Partikel beweglich sind, aufgebracht werden

Die mit der vorliegenden Erfindung zu lösende Aufgabe kann darin gesehen werden, daß bei einem Verfahren zur elektrophoretischen Trennung von Partikeln ein alternatives Substrat als Medium für den Transport der Partikel verwendet wird.

Dokument **D10** beschreibt die Nutzbarkeit von substratgestützten Membranen aus Lipid-Doppelschichten zur Trennung von Gemischen, deren Moleküle auf der Oberfläche der Membran assoziiert sind (sp 1 auf s 1048, 2. Absatz) und verweist an gleicher Stelle auf eine Anwendung in der Elektrophorese von zwei Lipiden. Dokument **D10** beschreibt somit hinsichtlich des Merkmals "substratgestützte



Membran" dieselben Vorteile wie die vorliegende Anmeldung. Der Fachmann würde daher die Aufnahme dieses Merkmals in das in **D1** beschriebene Verfahren als eine konstruktive Maßnahme zur Lösung der gestellten Aufgabe ansehen. Somit würde der Fachmann durch Kombination der Dokumente **D1** und **D10** zur Lösung der in der vorliegenden Anmeldung gestellten Aufgabe kommen. Die in **Anspruch 1** der vorliegenden Anmeldung vorgeschlagene Lösung kann daher **nicht** als **erfinderisch** betrachtet werden (**Artikel 33(3) PCT**).

Es sei ferner darauf hingewiesen, dass das Merkmal "das die Kraft, die durch das elektrische Feld auf die Partikel wirkt, zu einer von der **Länge der Partikel abhängigen** Bewegung führt" lediglich ein gewünschtes Resultat, jedoch kein verfahrenskennzeichnendes Merkmal darstellt. Das Merkmal wird daher zurückgewiesen (siehe **PCT Richtlinien (Gazette) Sektion IV, III-4.7**).

2. Der - als unabhängig formulierte - **Anspruch 16 erfüllt nicht** die Anforderungen von **Artikel 33(3) PCT**, da in dem Anspruch versucht wird, den Gegenstand durch das zu erreichende Ergebnis zu definieren; damit wird aber lediglich die zu lösende Aufgabe angegeben (siehe **PCT Richtlinien (Gazette) Sektion IV, III-4.7**). Es ist daher kein erfinderischer Schritt zu erkennen.
3. Die, als unabhängig formulierten, **Ansprüche 21, und 29 erfüllen nicht** die Anforderungen von **Artikel 33(2) PCT**, da die **Merkmale** der Ansprüche **nicht neu** sind (siehe **D10** sp 1 auf s 1047, 1. Absatz).
Der von Anspruch 21 abhängige **Anspruch 22 und** die von Anspruch 29 abhängigen **Ansprüche 31 und 32 erfüllen ebenfalls nicht** die Anforderungen von **Artikel 33(2) PCT**, da die **Merkmale** der Ansprüche ebenfalls **nicht neu** sind (siehe **D10** sp 1 auf s 1047).
4. Der, als unabhängig formulierte, **Anspruch 35 erfüllt nicht die Anforderungen von Artikel 33(2) PCT**, da die **Merkmale** des Anspruchs **nicht neu** sind (siehe **D1** sp 9, z 22-27, z 43-45 und sp 10, z 21-51).
Dies gilt in gleicher Weise für die von ihm abhängigen **Ansprüche 36-41**.
5. Die abhängigen Ansprüche 4-6, 9-11, 13, 17, 22-28, 31, 32, 34, 36-41, 43, 44 und 46 enthalten keine Merkmale, die in Kombination mit den Merkmalen irgendeines



Anspruchs, auf den sie sich beziehen, die Erfordernisse des PCT in Bezug auf erfinderische Tätigkeit (**Artikel 33(3) PCT**) erfüllen, da ihre entsprechenden Merkmale entweder in den Dokumenten **D1, D3 oder D10** offenbart werden, oder kein technischer Effekt ersichtlich ist, der auf eine erfinderische Tätigkeit schliessen liesse.

6. Die Erfordernisse des **Artikels 33(4) PCT** werden von Ansprüchen 1-46 **erfüllt**.

Zu Punkt VII

Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

1. Der unabhängige Anspruch 1 ist nicht in der zweiteiligen Form nach **Regel 6.3 b) PCT** abgefaßt.
2. Im Widerspruch zu den Erfordernissen der **Regel 5.1 a) ii) PCT** werden in der Beschreibung weder der in den Dokumenten **D1, D3, D10** offenbarte einschlägige Stand der Technik noch diese Dokumente angegeben.

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

1. Betreffend **Anspruch 13**: Es ist unklar, welche Bewegung (von was) gemeint ist. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass eine Umformulierung des Anspruchs unmöglich erscheint, da dies aller Voraussicht nach gegen **Artikel 19(2) PCT** verstossen würde.
2. **Anspruch 20** ist widersprüchlich formuliert: Es ist unklar, wie der pH-Gradient gleichzeitig parallel und senkrecht (a 19 und 20) zu dem elektrischen Feld verlaufen könnte.
3. In **Anspruch 35** ist der Verweis auf ein Substrat nach den Ansprüchen 18-20 inkorrekt, da sich letztere auf das Verfahren aus Anspruch 1 beziehen und in keiner Weise auf ein Substrat.



Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PCT 1213-06556/JS	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/07206	International filing date (<i>day/month/year</i>) 26 July 2000 (26.07.00)	Priority date (<i>day/month/year</i>) 26 July 1999 (26.07.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC B01D57/00		
Applicant KAHL, Johan-Valentin		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>7</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 23 February 2001 (23.02.01)	Date of completion of this report 06 November 2001 (06.11.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages _____ 1-20 _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
pages _____ 1-46 _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the drawings:
pages _____ 1/3-3/3 _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 00/07206

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-20, 23-28, 30, 33, 34, 42-46	YES
	Claims	21, 22, 29, 31, 32, 35-41	NO
Inventive step (IS)	Claims	2, 3, 7, 8, 12, 14, 15, 18-20, 30, 33, 42, 45	YES
	Claims	1, 4-6, 9-11, 13, 16, 17, 21-29, 31, 32, 34-41, 43, 44, 46	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-46	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Subject to the possibility of references being made to other documents in the course of the proceedings, attention is drawn to the following international search report citations:

D1: US-A-5 427 663 (AUSTIN ROBERT H et al.), 27 June 1995 (1995-06-27)

D3: WO-A-96/42012 (MARUZZO BRUNO; STEVENS JOHN K (CA); WATERHOUSE PAUL (CA); YAGER TH), 27 December 1996 (1996-12-27)

The following new document is cited by the Examining Authority:

D10: OUDENAARDEN, BOXER: "Brownian Ratchets: Molecular separation in lipid bilayers supported on patterned arrays", SCIENCE, 13 August 1999, Vol. 285, pages 1046-1048

Note: This article was submitted to the journal on 26 March 1999; that is, before the priority date of the present application.

1.1 Independent Claim 1 meets the requirement of PCT Article 33(2) in respect of novelty for the following reasons:

- Document **D1** does not disclose the depositing of particles (for separation by electrophoresis) on a substrate-supported membrane over the surface of which the particles are able to move.



- Document **D3** does not disclose a substrate-supported membrane.
- Document **D10** describes how substrate-supported membranes made of lipid bilayers can be used to separate mixtures whose molecules are associated on the membrane surface (page 1048, column 1, second paragraph), and refers (ibid.) to an application involving the electrophoresis of two lipids (see point 1.2 below). However, the electrophoresis process is not described in detail.

1.2 **Independent Claim 1 fails to meet** the requirement of PCT Article 33(3) in respect of inventive step for the following reasons:

Document D1, which is considered to be the prior art closest to the subject matter of Claim 1, discloses the following (the references in parentheses are to D1):

a method for the electrophoretic separation of particles (column 1, lines 9-11), more particularly of macromolecules (Claim 63), involving:

- placing the particles to be separated in a fluid medium and transferring the medium together with the particles contained therein to an electrophoresis chamber (Claim 63);
- applying an electric field oriented in line with the surface over which the particles are able to move (column 10, lines 21-51), such that the particles are acted upon by a force which causes them to move (column 10, lines 25-26). **D1** also describes the possibility of using alternating voltage instead of direct voltage (column 10, lines 48-51).

The subject matter of **Claim 1 differs** from the known process **in that**:

- a) the particles are deposited on a **substrate-supported**



membrane over the surface of which they are able to move.

The problem addressed by the present invention can be seen as that of using a different type of substrate as a medium for particle conveyance in a method for the electrophoretic separation of particles.

Document **D10** describes how substrate-supported membranes made of lipid bilayers can be used to separate mixtures whose molecules are associated on the membrane surface (page 1048, column 1, second paragraph), and refers (ibid.) to an application involving the electrophoresis of two lipids. **D10** describes the same advantages as the present application with regard to the feature "substrate-supported membrane". A person skilled in the art would therefore regard the incorporation of this feature in the method described in **D1** as a design aspect of the solution to the problem at hand, and by combining the teachings of **D1** and **D10** would arrive at the solution to the problem addressed by the present invention. The solution proposed in **Claim 1** of the present application **cannot therefore be considered inventive (PCT Article 33(3))**.

It is further noted that the feature according to which the force acting on the particles through the electric field "causes a movement **governed by the length of the particles**" is merely a desired result, not a characterising feature of the method. This feature is therefore inadmissible (see **PCT Examination Guidelines (Gazette), Section IV, Chapter III-4.7**).

2. **Claim 16**, which is presented as an independent claim, **fails to meet the requirement of PCT Article 33(3)** because it seeks to define its subject matter in terms of the result which is to be achieved, and in doing so merely states the problem addressed (see **PCT Examination Guidelines (Gazette), Section IV, Chapter III-4.7**). It is



therefore not possible to acknowledge an inventive step.

3. **Claims 21 and 29**, which are presented as independent claims, **fail to meet the requirement of PCT Article 33(2)** because **their features lack novelty** (see D10, page 1047, column 1, first paragraph).

Claim 22 (dependent on Claim 21) and **Claims 31 and 32** (dependent on Claim 29) likewise **fail to meet the requirement of PCT Article 33(2)** because **their features also lack novelty** (see D10, page 1047, column 1).

4. **Claim 35**, which is presented as an independent claim, **fails to meet the requirement of PCT Article 33(2)** because **its features lack novelty** (see D1, column 9, lines 22-27 and 43-45, and column 10, lines 21-51). The same applies to dependent **Claims 36-41**.

5. Dependent Claims 4-6, 9-11, 13, 17, 22-28, 31, 32, 34, 36-41, 43, 44 and 46 do not contain any features that meet the PCT requirements relating to inventive step (**PCT Article 33(3)**) when taken in conjunction with the features of any of the claims to which they refer back. The features of these claims either are disclosed in **D1, D3 or D10**, or are not associated with any technical effect that might be indicative of an inventive step.

6. Claims 1-46 **meet the requirement of PCT Article 33(4)**.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 00/07206

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

1. Independent Claim 1 has not been drafted in the two-part form defined by **PCT Rule 6.3(b)**.
2. Contrary to the requirements of **PCT Rule 5.1(a)(ii)**, the description does not cite documents **D1**, **D3** and **D10** or indicate the relevant prior art disclosed therein.



VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. With regard to **Claim 13**, it is not clear what movement is meant or what it is that is moving. Moreover, there does not seem to be any way in which the claim could be reformulated without contravening the requirement of **PCT Article 19(2)**.
2. **Claim 20** is self-contradictory. It is not clear how the pH gradient can be both parallel and perpendicular to the electric field at the same time (Claims 19 and 20).
3. In **Claim 35**, the reference to a substrate according to Claims 18-20 is incorrect because Claims 18-20 relate to the method defined in Claim 1, not to a substrate.



(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
1. Februar 2001 (01.02.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/07150 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: B01D 57/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/07206

(22) Internationales Anmeldedatum:
26. Juli 2000 (26.07.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 35 028.0 26. Juli 1999 (26.07.1999) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: KAHL, Johan-Valentin [DE/DE]; Amalien-
strasse 49a, 80799 München (DE). NISSEN, Julia

[DE/DE]; Peissenbergstr. 4, 81547 München (DE).
RÄDLER, Joachim [DE/DE]; Römerhofweg 51, 85748
Garching (DE). ZANTL, Roman [DE/DE]; Odeonsplatz
2, 80539 München (DE). MAIER, Berenike [DE/DE];
Rathausstrasse 34, 85757 Karlsfeld (DE). RÄDLER, Ulf
[DE/DE]; Marchgrabenplatz 1a, 80805 München (DE).

(72) Erfinder; und

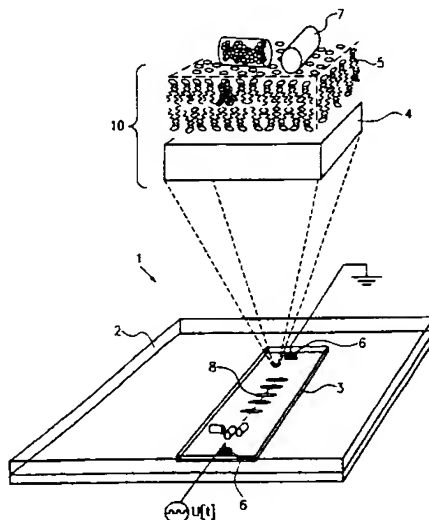
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HOHNER, Andreas
[DE/DE]; Leberblümchenstr. 18, 80995 München (DE).
GÄLNEDER, Reinhard [DE/DE]; Guerickestr. 19,
80805 München (DE).

(74) Anwalt: GRÜNECKER, KINKELDEY, STOCKMAIR
& SCHWANHÄUSSER; Maximilianstrasse 58, 80538
München (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR THE ELECTROPHORETIC SEPARATION OF PARTICLES, ESPECIALLY OF
MACROMOLECULES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNGEN ZUR ELEKTROPHORETISCHEN TRENNUNG VON
PARTIKELN, INSBESONDERE VON MAKROMOLEKÜLEN



(57) Abstract: The invention relates to a method for the electrophoretic separation of particles, especially of macromolecules. The inventive method comprises the following steps: applying the particles to be separated on a substrate-supported membrane so that the particles are mobile across the surface of the substrate-supported membrane, supplying an electrical field in such a manner that electrical fields are formed across the surfaces across which the particles are mobile, temporarily modifying the electrical fields and/or using a substrate-supported membrane with a structured surface, the direction and strength of the electrical field being temporarily modified such and/or the substrate-supported membrane being structured such that a force is acting on the particles that leads to a movement that depends on the length of the particles. The invention further provides a substrate especially for supporting a membrane that consists of an optically transparent

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 01/07150 A2

(81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), curassisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

material and that is used in the inventive method. The invention is also characterized by a substrate-supported membrane for carrying out the inventive method with an inventive substrate according to any of the claims, and a fluid lipid membrane. The invention provides a micro-channel electrophoresis chamber with at least one channel the bottom of which comprises an inventive substrate and with an electrode system.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung zeichnet sich aus durch ein Verfahren zur elektrophoretischen Trennung von Partikeln, insbesondere von Makromolekülen, mit den Schritten eines Aufbringens der zu trennenden Partikel in eine substratgestützte Membran, so dass die Partikel entlang der Oberfläche der substratgestützten Membran beweglich sind, eines Vorsehens eines elektrischen Feldes, derart dass entlang der Oberfläche, entlang der die Partikel beweglich sind, E-Felder ausgebildet werden, und eines zeitlichen Veränderns des elektrischen Feldes und/oder eines Verwendens einer substratgestützten Membran mit einer strukturierten Oberfläche, wobei Richtung und Stärke des elektrischen Feldes zeitlich so verändert werden und/oder die Substratgestützte Membran so strukturiert ist, dass auf die Partikel eine Kraft wirkt, die zu einer von der Länge der Partikel abhängigen Bewegung führt. Weiterhin schafft die Erfindung ein Substrat, insbesondere zur Stützung einer Membran bei der Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens aus optisch transparentem Material. Darüber hinaus zeichnet sich die Erfindung durch eine substratgestützte Membran zur Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens mit einem erfindungsgemässen Substrat nach einem der Ansprüche, und einer fluiden Lipidmembran aus. Ausserdem schafft die Erfindung eine Mikrokanalelektrophoresekammer mit wenigstens einem Kanal, dessen Bodenfläche ein erfindungsgemässes Substrat aufweist, und mit einer Elektrodenanordnung.

Verfahren und Vorrichtungen zur elektrophoretischen Trennung von Partikeln, insbesondere von Makromolekülen

Gebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren und Vorrichtungen zur elektrophoretischen Trennung von Partikeln, insbesondere von Makromolekülen, wie beispielsweise DNA-, RNA-Makromoleküle, DNA-, RNA-Oligomere und Proteinen.

Stand der Technik

Elektrophoreseverfahren werden insbesondere in der Molekularbiologie, der Gentechnik und der Medizin eingesetzt, um Makromoleküle verschiedener Ladung und verschiedener Größe voneinander zu trennen.

Im Stand der Technik sind im wesentlichen zwei verschiedene Elektrophoreseverfahren zum Trennen von Makromolekülen, nämlich die sogenannte Gelelektrophorese und die Kapillargelelektrophorese bekannt. Bei der Gelelektrophorese wird ein auf einer Platte aufgebracht Gel verwendet; bei der Kapillargelelektrophorese wird eine gel-ähnliche Polymerlösung in einer Kapillare vorgesehen.

Sowohl bei der Gel- als auch bei der Kapillargelelektrophorese nützt man die Tatsache aus, dass Makromoleküle mit verschiedener Ladung und Größe unter Einfluss eines äußeren elektrischen Feldes in einem Gel mit unterschiedlicher Geschwindigkeit wandern. Dadurch entstehen Banden, welche jeweils eine Spezies der verschiedenen Makromoleküle, also die Makromoleküle mit gleicher Ladung bzw. gleicher Größe, enthalten. Die Lage der Banden wird durch Färbetechniken oder UV-Lichtabsorption optisch ausgelesen.

Zum Auslesen der Banden wird hierzu auf das Gel eine Schicht eines Anfärbemittels aufgebracht und dort bei genau kontrollierter Temperatur für eine bestimmte Zeit be-

lassen. Danach wird die Anfärbereaktion durch Entzug des Wassers aus dem Gel unterbunden.

Als Gele verwendet man typischerweise Agarose, Celluloseacetat oder Acrylamid. Die Gel- und Kapillargelelektrophorese wird beispielsweise bei der DNA-Analyse in der medizinischen Forschung und Diagnose verwendet. Durch Restriktionsfragmentanalyse können beispielsweise Aussagen über Erbinformation getroffen werden, weshalb die Gelelektrophorese bei der Diagnose von genetisch bedingten Krankheiten große Bedeutung erlangt hat.

Die wesentlichen Nachteile des Gel- und des Kapillarelektrophoreseverfahrens sind zum einen der erhebliche Zeitaufwand zur Vorbereitung und Durchführung der Elektrophorese und zum anderen, dass große Mengen an Probenmaterial zur Analyse benötigt werden.

Insbesondere sind in beiden Verfahren die gebräuchlichen Elektrophoresewege verhältnismäßig lang. Dies führt zu Wanderzeiten von ca. 2 Stunden. Weiterhin muss vor dem eigentlichen Elektrophoresevorgang zunächst das Gel vorbereitet werden, beispielsweise gegossen werden. Eine Automatisierung dieses Vorgangs ist zwar möglich, jedoch mit hohem Aufwand verbunden, da die notwendigen Geräte hohe Kosten verursachen. Deshalb wird die Elektrophorese oft per Hand durchgeführt, was zu einer weiteren Erhöhung des Zeitaufwands führt.

Weiterhin lassen sich die bekannten Verfahren nicht beliebig miniaturisieren, um beispielsweise die erforderlichen Probenmengen gering zu halten.

Angesichts der aufgeführten Nachteile liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren und Vorrichtungen zur Durchführung eines Verfahrens zu schaffen, in dem bzw. mit denen einerseits der Zeitaufwand zur Trennung von Makromolekülen mittels der Elektrophorese verringert werden kann und die andererseits zur Miniaturisierung geeignet sind, so dass bereits geringe Probenmengen zur Analyse ausreichen.

Beschreibung der Erfindung

Die zuvor genannte Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur elektrophoretischen Trennung von Partikeln, insbesondere von Makromolekülen, mit den Schritten eines Aufbringers der zu trennenden Partikel auf eine substratgestützte Membran, so dass die Partikel entlang der Oberfläche der substratgestützten Membran beweglich sind, eines Vorsehens eines elektrischen Feldes, derart dass die Feldrichtung entlang der Oberfläche, entlang der die Partikel beweglich sind, ausgerichtet ist, und eines zeitlichen Veränderns des elektrischen Feldes und/oder eines Verwendens einer substratgestützten Membran mit einer strukturierten Oberfläche, wobei das elektrische Feld zeitlich so verändert wird und/oder die substratgestützte Membran so strukturiert ist, dass auf die Partikel eine Kraft wirkt, die zu einer von der Länge der Partikel abhängigen Bewegung führt.

Durch bestimmte Auswahl des angelegten elektrischen Feldes und/oder eine entsprechende Strukturierung der Membran wirkt auf die Partikel eine Kraft, die von der Länge der Makromoleküle abhängt, so dass für Makromoleküle in Abhängigkeit von ihrer Größe eine unterschiedliche Weglänge in dem elektrischen Feld resultiert. Gegenüber dem Stand der Technik können bei dem erfindungsgemäßen Verfahren die Laufzeiten dadurch stark verringert werden, dass sich die Makromoleküle nicht mehr in dem Gel fortbewegen müssen, sondern lediglich an der Oberfläche der Membran gebunden sind, im übrigen aber frei beweglich sind. Die hohe Mobilität der Makromoleküle auf der Membran führt somit zur einer erheblichen Verringerung der Zeitdauer zur Durchführung der Elektrophorese. Weiterhin ist der Zeitaufwand zur Herstellung einer Membran wesentlich geringer als der Zeitaufwand, der zum Gießen eines Gels erforderlich ist.

Gemäß einer bevorzugten Weiterbildung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird als substratgestützte Membran eine fluide Lipidmembran verwendet. Durch eine derartige Membran wird sichergestellt, dass die Partikel einerseits an der Membran gebunden werden und andererseits eine hinreichend hohe Mobilität auf der Oberfläche der Membran haben. Die aus dem Stand der Technik bekannte dreidimensionale Bewegung kann somit auf eine quasi-zweidimensionale Bewegung zurückgeführt werden.

Derartige Membranen können beispielsweise PEG funktionalisierte Lipide oder DAC-Chol: 3-beta-(N-(N,N'-Dimethylaminoethan)-carbonyl)(-cholesterolhydrochlorid) umfassen.

Vorzugsweise kann hierzu eine kationische fluide Lipidmembran verwendet werden. Durch eine derartige Membran lassen sich die in der Regel negativ geladenen DNA-, RNA-Makromoleküle, bzw. DNA-, RNA-Oligomere an die Membran binden.

Gemäß einer anderen Weiterbildung können zum Aufbau der fluiden Membran amphiphile Makromoleküle verwendet werden. Amphiphile Moleküle zeichnen sich dadurch aus, dass sie Mono- und Doppelschichten in wässriger Lösung formen.

Entsprechend einer anderen Weiterbildung der zuvor beschriebenen Verfahren kann eine fluide Lipidmembran verwendet werden, die Mono- bzw. Doppelschichten aus geladenen Lipiden aufweist. Hierdurch wird einerseits eine gute Haftung der Membran an dem Substrat gewährleistet und andererseits die Bindung der Makromoleküle an der Membran sichergestellt. Darüber hinaus kann auf diese Weise die Membran vergleichsweise dünn ausgebildet werden, so dass eine Beobachtung der Banden mit optischen Einrichtungen problemlos möglich ist.

Gemäß einer ersten Alternative der zuvor beschriebenen Verfahren wird ein gepulstes elektrisches Feld verwendet. Die Makromoleküle verschiedener Größe, die auf die Membran aufgebracht worden sind, führen zunächst eine ungeordnete Brown'sche Bewegung durch. Wenn nun ein gepulstes elektrisches Feld angelegt wird, richten sich die verschiedenen Makromoleküle während des ersten Pulses entlang der Feldlinien aus. Diese Ausrichtung findet in Abhängigkeit von der Größe der Makromoleküle statt, wobei sich die kleineren Makromoleküle schneller als die größeren Makromoleküle ausrichten. Nachdem ein Makromolekül im elektrischen Feld ausgerichtet ist, beginnt es mit seiner Bewegung in Richtung des Feldgradienten. Folglich beginnen kleinere Makromoleküle eher als größere Makromoleküle mit der Bewegung im elektrischen Feld. In dem Zeitraum zwischen dem ersten und dem zweiten Puls findet wieder eine ungeordnete Brown'sche Bewegung der Makromoleküle statt; allerdings führen die

kleineren Makromoleküle aufgrund ihrer größeren, während des ersten Pulses zurückgelegten Strecke ihre ungeordnete Bewegung an einem anderen Ort als die größeren Makromoleküle durch. Wenn nun der zweite Puls angelegt wird, findet wiederum eine Ausrichtung der Makromoleküle entlang der Feldlinien statt. Auch hierbei richten sich kleinere Makromoleküle schneller als größere Makromoleküle aus und legen während des zweiten Pulses wiederum eine größere Strecke im elektrischen Feld zurück. Insgesamt kann auf diese Weise eine Separierung der Makromoleküle in Abhängigkeit von ihrer Größe erzielt werden.

Entsprechend einer zweiten Alternative der oben beschriebenen Verfahren kann ein Wechselfeld verwendet werden, dem ein zeitlich konstantes Feld überlagert ist. Durch das zeitlich konstante Feld werden die Makromoleküle im Wesentlichen in Richtung der Feldlinien bewegt. Die Bewegung in diesem Feld wird allerdings auch durch das Wechselfeld, in dem sich die Makromoleküle ausrichten, beeinflusst. Da sich analog zum obigen Fall die Makromoleküle mit einer Geschwindigkeit, die mit ihrer Größe abnimmt, im Wechselfeld ausrichten und darüber hinaus im Wechselfeld bewegen, legen die kleineren Makromoleküle in einer Zeiteinheit wiederum eine größere Strecke zurück. Dadurch dass die Makromoleküle unter dem Einfluss des Wechselfeldes nicht nur ausgerichtet werden, sondern sich auch im Wechselfeld bewegen, führen die Makromoleküle insgesamt eine Zick-Zack-Bewegung auf der Oberfläche der Membran durch.

Vorteilhafterweise können hierbei das Wechselfeld und das zeitlich konstante Feld kreuzartig überlagert werden. In diesem Fall ergibt sich ein symmetrischer Weg der Makromoleküle auf der Membran.

Zusätzlich kann in den Verfahren gemäß der ersten und der zweiten Alternative zur Stützung der Membran ein Substrat verwendet werden, dessen Oberfläche Rippen aufweist. Hierdurch wird die Bewegung, insbesondere eine Ausrichtung der Makromoleküle im elektrischen Feld in Abhängigkeit von ihrer Größe noch weiter beeinflusst. Insbesondere wird die Reibungskraft bei der Ausrichtung für größere Makromoleküle stärker erhöht als für kleinere Makromoleküle, was insgesamt zu einer weiteren Diskriminierung bezüglich der Größe der Makromoleküle führt.

Zur Durchführung des Verfahrens hat sich hierbei ein Substrat als zweckmäßig erwiesen, dessen Rippen eine Periodizität in einem Bereich von 2nm bis 200nm aufweisen. Vorteilhafterweise liegt hierbei die Höhe der Rippen in einem Bereich von 0.1nm bis 10nm.

Entsprechend einer dritten Alternative der zuvor beschriebenen Verfahren kann bei Verwendung einer Membran, die auf einem Substrat mit Rippen vorgesehen ist, ein zeitlich konstantes Feld, dessen Richtung im wesentlichen senkrecht zu den Rippen verläuft, verwendet werden. Hierbei erfahren größere Makromoleküle eine höhere Reibungskraft als kleinere Makromoleküle, wodurch sich für diese größeren Makromoleküle eine kleinere Geschwindigkeit in Feldrichtung ergibt. Hierdurch wird wiederum eine längenabhängige Separierung der Makromoleküle erzielt.

Entsprechend einer vorteilhaften Weiterbildung aller zuvor beschriebenen Verfahren wird eine Membran verwendet, die einen Sperrbereich aufweist, in den keine Bewegung der Partikel möglich ist bzw. an deren Grenze die Makromoleküle gestoppt werden. Durch Anlegen eines entsprechenden elektrischen Feldes vor der Durchführung der eigentlichen Elektrophorese lassen sich so die Partikel in einem schmalen Bereich vor diesem Sperrbereich sammeln. Hierdurch wird ein klar definierter Startpunkt und eine enge Bandbreite für die während der Elektrophorese durchgeführte Bewegung definiert. Dies führt insgesamt zu einer verbesserten Auflösung des Verfahrens.

Bei Verwendung einer fluiden Membran kann der Sperrbereich durch einen nicht fluiden Bereich in der fluiden Membran realisiert werden. Dieser lässt sich beispielsweise dadurch erzielen, dass das Substrat mit einem Material beschichtet wird, auf dem die eigentlich fluide Membran nicht fluide ist. Hierzu eignet sich beispielsweise Al_2O_3 . Ein derartiger Sperrbereich kann auch dadurch erzielt werden, dass auf dem Substrat ein anderes Material aufgebracht wird, so dass sich in diesem Bereich keine fluide Membran ausbilden kann. Hierzu eignet sich beispielsweise Al_2O_3 .

Die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren können in einem Verfahren zur Beobachtung einer elektrophoretischen Trennung eingesetzt werden. Hierzu werden, während der Durchführung einer elektrophoretischen Trennung, vorzugsweise digitalisierte Bilddaten, beispielsweise mit einer an einem optischen Mikroskop angeschlossenen Videokamera aufgezeichnet. Nachfolgend können diese aufgezeichneten Bilddaten computergestützt ausgewertet werden.

Gegenüber dem Stand der Technik hat diese Weiterbildung den großen Vorteil, dass auch dynamische Prozesse auf einfache Weise beobachtet werden können. So ist es beispielsweise möglich, DNA-schneidende Enzyme bei ihrer Aktivität zu beobachten.

Die oben beschriebenen Verfahren zur elektrophoretischen Trennung eignen sich, wie bereits angedeutet, besonders zur Trennung von DNA-, RNA-Makromolekülen, DNA-, RNA-Oligomeren. Darüber hinaus lassen sich mit diesem Verfahren aber auch eine Vielzahl anderer Makromoleküle, wie beispielsweise Proteine, untersuchen.

Vorteilhafterweise kann zur Erhöhung der Auflösung die sogenannte isoelektrische Fokussierung verwendet werden. Hierbei wandern die Partikel in einem pH-Gradienten bis zu einem pH-Wert, der ihrem isoelektrischen Punkt entspricht, an dem sie eine Nettoladung von Null haben. Das heißt die Wanderungsgeschwindigkeit ist an diesem Punkt ebenfalls Null. In der eindimensionalen Proteinelektrophorese ist das pH-Gradientenfeld parallel zum elektrischen Feld. In der 2D Elektrophorese steht der pH-Gradient senkrecht zum angelegten Feld.

Erfindungsgemäß wird weiterhin ein Substrat, insbesondere zur Stützung einer Membran, bei der Durchführung eines der oben beschriebenen Verfahren geschaffen, das aus optisch transparentem Material besteht. Mit einem derartigen Substrat ist es, insbesondere im Zusammenhang mit der relativ dünnen Membran möglich, die Banden der verschiedenen Makromolekülgrößen, die sich nach einer elektrophoretischen Trennung eingestellt haben, direkt, beispielsweise mittels eines optischen Mikroskops, zu beobachten oder mit einer Videokamera aufzuzeichnen. Dies führt zu dem Vorteil, dass die Makromoleküle bei der Analyse im nativen Zustand erhalten bleiben, wodurch sie

später folgenden Analyseschritten, beispielsweise einer DNA-Hybridisierung, zugänglich bleiben.

Gemäß einer Weiterbildung kann das Substrat Glas als optisch transparentes Material aufweisen.

Alternativ lassen sich auch Kunststoffe als optisch transparentes Material einsetzen. Hierzu lassen sich insbesondere Kunststoffe, wie PC, PMMA, PS, PE oder Plastik aus zyklischen Olefinen verwenden. Da Kunststoffe einfacher als Glas zu verarbeiten sind, eignen sie sich insbesondere wenn das Substrat komplizierte Strukturen, beispielsweise zur Durchführung eines Verfahrens mit einem strukturierten Substrat aufweisen soll.

In den Verfahren, in denen ein strukturiertes Substrat verwendet wird, eignet sich insbesondere ein Substrat mit einer Oberfläche, die Rippen aufweist. Vorteilhafterweise haben die Rippen in dem Substrat eine Periodizität in einem Bereich von 2nm bis 200nm. Als eine Höhe der Rippen hat sich insbesondere eine Höhe in einem Bereich von 0.1nm bis 10nm als günstig erwiesen.

Der wesentliche Punkt bei strukturierten Substraten ist, dass Makromoleküle, die sich auf einer Membran, die auf einem derartigen Substrat aufgebracht ist, eine von ihrer Größe abhängige Reibungskraft erfahren. Demgemäß lassen sich auch anders geformte Strukturen, die zu diesem Effekt führen, einsetzen.

Obwohl diese Substrate auf vorteilhafte Weise in den zuvor beschriebenen Verfahren verwendet werden können, lassen sie sich auch in anderen Anwendungen, beispielsweise beim Strecken oder Orientieren von Makromolekülen, einsetzen. Dies gilt insbesondere für die Substrate mit strukturierter Oberfläche, beispielsweise der rippenförmigen Oberfläche.

Außerdem wird erfindungsgemäß eine substratgestützte Membran geschaffen, die sich insbesondere zur Durchführung der oben beschriebenen Verfahren eignet, die eines

der zuvor beschriebenen Substrate und eine auf dem jeweiligen Substrat aufgebrachte fluide Lipidmembran aufweist.

Durch diese substratgestützte Membran wird eine einfache Einrichtung zur Durchführung der oben beschriebenen Verfahren zur Verfügung gestellt.

Vorteilhafterweise kann die substratgestützte Membran eine fluide Lipidmembran mit kationischen Lipiden aufweisen. Es lassen sich vorteilhafterweise auch amphiphile Makromoleküle zur Ausbildung der Membran verwenden. Darüber hinaus kann die fluide Lipidmembran Doppelschichten aus geladenen Lipiden aufweisen. Auch kann die fluide Membran der substratgestützten Membran wenigstens einen nicht fluiden Bereich aufweisen.

Mit diesen vorteilhaften Weiterbildungen können die bereits im Zusammenhang mit den Verfahren diskutierten Vorteile erzielt werden. Um Wiederholungen zu vermeiden wird hier lediglich auf die entsprechenden Stellen bei der Beschreibung der erfindungsgemäßen Verfahren verwiesen.

Entsprechend einer anderen Weiterbildung kann die fluide Lipidmembran der substratgestützten Membran eingetrocknet sein. Dadurch kann das Substrat mit der eingetrockneten Membran gelagert werden. Zum Einsatz der substratgestützten Membran muss diese dann lediglich mit Wasser und/oder einer Pufferlösung aufgequollen werden. Bei derart vorbereiteten Membranen können etwaige Fehler und Abweichungen beim Herstellen der Membran, insbesondere beim Ansetzen der Lösungen für die Membran, vermieden werden, so dass die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen erhöht wird.

Erfindungsgemäß wird darüber hinaus eine Mikrokanalelektrophoresekommer geschaffen mit wenigstens einem Kanal, dessen Bodenfläche eines der zuvor beschriebenen Substrate aufweist, und mit einer Elektrodenanordnung aufweist.

In einer derartigen Mikrokanalelektrophorese-
kammer können die einzelnen Arbeits-
schritte, wie die Festlegung des Startpunktes, das elektrophoretische Trennen der Par-
tikel durch Bewegung im elektrischen Feld und die optische Auswertung der Banden,
integriert werden. Demnach wird das Verfahren gegenüber dem Stand der Technik,
gemäß dem es erforderlich war, diese Arbeitsschritte in verschiedenen Stufen und an
verschiedenen Arbeitsplätzen durchzuführen, erheblich vereinfacht werden. Weiterhin
ist es in einer derartigen Mikrokanalelektrophorese-
kammer möglich, Makromoleküle
auszustrecken, zu manipulieren und gleichzeitig optischen Methoden zugänglich zu
machen.

Vorteilhafterweise haben hierbei jeder Kanal eine Breite in einem Bereich von $1\mu\text{m}$ bis
10mm und eine Tiefe in einem Bereich von $1\mu\text{m}$ bis $5000\mu\text{m}$.

Entsprechend einer vorteilhaften Weiterbildung kann die Mikrokanalelektrophorese-
kammer eine Mehrzahl von Kanälen umfassen, die in Form einer zweidimensionalen
Matrix angeordnet sind. Hierdurch ist es möglich, eine Mehrzahl von Experimenten
gleichzeitig durchzuführen.

Gemäß einer bevorzugten Weiterbildung der Mikrokanalelektrophorese-
kammer kann die Elektrodenanordnung zwei jeweils an den Längsenden eines jeden Kanals vorge-
sehene Elektroden aufweisen. Diese Weiterbildung führt zu einer weiteren Vereinfachung
der Versuchsanordnung. So können hierdurch die Elektroden bereits in der
Mikrokanalelektrophorese-
kammer integriert werden und die Mikrokanalelektrophorese-
kammer muss am Messplatz lediglich angeschlossen werden. Weiterhin kann dadurch,
dass die Elektroden bereits in der Mikrokanalelektrophorese-
kammer vorgesehen sind,
eine vorbestimmte Anordnung in bezug auf jeden Kanal und damit auch in Bezug auf
jeden Kanal und damit auch in Bezug auf die Membran realisiert werden, was zu einem
gegenüber der Membran fest definierten Feld führt. Hierdurch lässt sich gegenüber
dem Stand der Technik eine weitere Miniaturisierung verwirklichen, die gemäß dem
Stand der Technik aufgrund der Positionierungsgenauigkeit des elektrischen Feldes in
Bezug auf die Membran beschränkt ist.

Gemäß einer anderen Weiterbildung kann die Elektrodenanordnung alternativ oder zusätzlich zwei Elektroden aufweisen, die sich zu beiden Seiten eines jeden Kanals in Kanallängsrichtung erstrecken. Diese Weiterbildung eignet sich insbesondere für das oben beschriebene Verfahren, in dem ein Wechselfeld und ein zeitlich konstantes dazu gekreuztes Feld vorgesehen werden. Selbstverständlich werden auch hier die Vorteile, die im Zusammenhang mit der oben beschriebenen Elektrodenanordnung diskutiert worden sind, erzielt.

In den zuvor beschriebenen Mikrokanalelektrophoresekamern kann das Substrat mit einer fluiden Lipidmembran beschichtet sein. Diese fluide Lipidmembran kann kationische Lipide aufweisen. Vorteilhafterweise kann die fluide Lipidmembran amphiphile Makromoleküle umfassen. Darüber hinaus kann die fluide Lipidmembran Doppelschichten aus geladenen Lipiden aufweisen, in eingetrockneter Form vorliegen und/oder wenigstens einen nicht fluiden Bereich aufweisen.

Durch diese speziellen Weiterbildungen können die bereits im Zusammenhang mit den verschiedenen Verfahren und den verschiedenen substratgestützten Membranen diskutierten Vorteile erzielt werden. Um Wiederholungen zu vermeiden, wird lediglich auf die betreffenden Diskussionen dieser Merkmale in diesem Zusammenhang mit den Verfahren und den substratgestützten Membranen verwiesen.

Im Folgenden wird die Erfindung anhand verschiedener Ausführungsbeispiele unter Bezugnahme auf die beigefügte Zeichnung beschrieben. In der Zeichnung zeigen:

Figur 1: eine Ausführungsform einer Mikrokanalelektrophoresekammer zur Erläuterung einer ersten Ausführungsform des Verfahrens zur elektrophoretischen Trennung von Partikeln gemäß der Erfindung;

Figur 2: eine erste Ausführungsform einer substratgestützten Membran zur Erläuterung einer zweiten Ausführungsform des Verfahrens zur elektrophoretischen Trennung von Partikeln gemäß der Erfindung; und

Figur 3: eine zweite Ausführungsform einer substratgestützten Membran zur Erläuterung einer dritten Ausführungsform des Verfahrens zur elektrophoretischen Trennung von Partikeln gemäß der Erfindung.

In Figur 1 ist eine Ausführungsform einer Mikrokanalelektrophoresekammer zur Erläuterung einer ersten Ausführungsform des Verfahrens zur elektrophoretischen Trennung von Partikeln gemäß der Erfindung dargestellt.

Diese Mikrokanalelektrophoresekammer 1 umfasst einen Kammerkörper 2, in dem ein Kanal 3 vorgesehen ist. Die Bodenfläche des Kanals 3 ist hierbei durch ein unstrukturiertes Substrat 4 ausgebildet. Das Substrat 4 ist optisch transparent ausgebildet, beispielsweise aus Glas, aus Kunststoff, wie PMMA, PC, PS, PE oder ähnlichen Materialien. Weiterhin ist das Substrat hierbei bis zu 100µm dünn. Hierdurch wird die Mikrokanalelektrophoresekammer 1 optischen Ausleseverfahren direkt zugänglich.

Das Substrat 4 kann in eine entsprechende Öffnung in den Kammerkörper eingesetzt werden, oder wie im vorliegenden Fall dargestellt, direkt als Teil des Kammerkörpers ausgebildet sein. Hierzu bietet sich an, einen Kanal mit der entsprechenden Tiefe in einem Bereich von 1µm-5000µm in dem Kammerkörper vorzusehen.

Auf dem Substrat ist eine fluide Membran 5 aufgebracht, wie insbesondere in der Ausschnittsdarstellung in Figur 1 zu sehen ist. In der vorliegenden Ausführungsform ist die Membran 5 in Form einer Doppelschicht Lipidmembran, beispielsweise einer DOPC/DOTAP-Membran, vorgesehen.

Weiterhin umfasst die Elektrophoresekammer eine Elektrodenanordnung 6 mit zwei an den Längsenden des Kanals 3 vorgesehenen Elektroden, die herkömmliche Materialien, wie Platin, Gold, Ag/AgCl etc. aufweisen. Eine dieser Elektroden ist geerdet; an die andere Elektrode wird, wie unten noch im Detail erläutert, eine gepulste Spannung im Bereich von 2 bis 1000V angelegt.

Wie weiterhin in der Ausschnittszeichnung dargestellt, befinden sich in der Membran 5 zwei Makromoleküle.

Die gesamte in Figur 1 dargestellte Anordnung, also die Membran 5, die Makromoleküle 7 und das Substrat 4 befinden sich in einer Flüssigkeit, beispielsweise in Wasser, oder molekülstabilisierender Puffer.

Im Folgenden wird eine erste Ausführungsform des Verfahrens zur elektrophoretischen Trennung von Makromolekülen unter Bezugnahme auf Figur 1 beschrieben.

In der in Figur 1 gezeigten Ausführungsform wird, wie auch in Figur 1 angedeutet, ein elektrisches Feld verwendet. Die Makromoleküle 7 verschiedener Größe, die auf die Membran 5 aufgebracht worden sind, führen zwischen den Spannungspulsen, also bei einer Spannung von 0V, eine ungeordnete Brown'sche Bewegung durch. Während der Spannungspulse hingegen richten sich die verschiedenen Makromoleküle zunächst entlang der Feldlinien aus. Diese Ausrichtung findet in Abhängigkeit von der Größe der Makromoleküle statt, wobei sich die kleineren Makromoleküle schneller als die größeren Makromoleküle ausrichten. Nachdem ein Makromolekül im elektrischen Feld ausgerichtet ist, beginnt es, ebenfalls während der Spannungsimpulse mit seiner Bewegung im elektrischen Feld, und zwar in Richtung des elektrischen Feldes. Da kleinere Makromoleküle im Feld schneller als größere Makromoleküle ausgerichtet werden, beginnen diese eher mit der Bewegung im elektrischen Feld und legen deshalb während eines Spannungspulses in dem Feld eine größere Strecke als die größeren Makromoleküle zurück.

Während des Anlegens einer gepulsten Spannung legen somit die Makromoleküle in Abhängigkeit von ihrer Ladung bzw. Größe verschiedene Strecken auf der Membran 5 in dem Kanal 3 zurück und sammeln sich entsprechend ihrer Ladung bzw. Größe in sogenannten Banden 8, wie dies in Figur 1 dargestellt ist.

In Figur 2 ist eine erste Ausführungsform einer substratgestützten Membran 10 zur Erläuterung einer zweiten Ausführungsform des Verfahrens zur elektrophoretischen Trennung von Partikeln gemäß der Erfindung dargestellt. Im Folgenden werden zur Vermeidung von Wiederholungen lediglich die Unterschiede zwischen beiden Anordnungen beschrieben. Gleiche Bezugszeichen bezeichnen hierbei gleiche Komponenten der entsprechenden Anordnungen.

Die substratgestützte Membran 10 in Figur 2 unterscheidet sich von der in Figur 1 dargestellten Anordnung im Wesentlichen durch die Elektrodenanordnung. Weiterhin ist die substratgestützte Membran 10 in einem Kammerkörper als Kanalboden vorgesehen. Die übrigen Komponenten entsprechen denjenigen der in Figur 1 gezeigten Struktur; zur Beschreibung derselben wird deshalb auf die entsprechende oben stehende Diskussion verwiesen.

Die Elektrodenanordnung umfasst in der in Figur 2 dargestellten substratgestützten Membran zwei Elektroden 6a und zwei Elektroden 6b. An die Elektroden 6a wird eine Gleichspannung, die vorzugsweise in einem Bereich von 2 bis 1000 V liegt, angelegt, an die Elektroden 6b eine Wechselspannung, die vorzugsweise in einem Bereich von 2 bis 1000 V liegt und eine Frequenz in dem Bereich von 0.1 bis 200 Hz aufweist.

Ebenso wie in der in Figur 1 gezeigten Anordnung befinden sich auch hier die Membran, das Substrat und Makromoleküle in einer Flüssigkeit, beispielsweise in Wasser.

Im Folgenden wird eine zweite Ausführungsform des Verfahrens zur elektrophoretischen Trennung von Makromolekülen unter Verwendung einer substratgestützten Membran, wie in Figur 2 gezeigt, beschrieben.

Durch das zeitlich konstante Feld, das durch die Elektroden 6a verursacht wird, werden die Makromoleküle im Wesentlichen in Richtung des Feldgradienten bewegt. Die Bewegung in diesem Feld wird allerdings auch durch das durch die Elektroden 6b erzeugte Wechselfeld, in dem sich die Makromoleküle zum einen ausrichten und zum anderen bewegen, beeinflusst. Da sich analog zum obigen Fall die Makromoleküle mit

einer Geschwindigkeit, die mit ihrer Größe abnimmt, im Wechselfeld ausrichten und darüber hinaus im Wechselfeld bewegen, legen die kleineren Makromoleküle in einer Zeiteinheit wiederum eine größere Strecke zurück. Dadurch, dass die Makromoleküle unter dem Einfluss des Wechselfeldes nicht nur ausgerichtet werden, sondern sich auch im Wechselfeld bewegen, führen sie insgesamt eine Zick-Zack-Bewegung auf der Oberfläche der Membran durch, wie dies in Figur 2 angedeutet ist.

Ebenso wie im Fall des ersten Verfahrens sammeln sich die Makromoleküle, da sie entsprechend ihrer Größe bzw. Ladung unterschiedliche Strecken zurücklegen, in den Banden 8, die in Figur 2 auf der Membran angedeutet und darüber hinaus in einem Histogramm dargestellt sind (das Histogramm zeigt hierbei die Anzahl der Moleküle in Abhängigkeit der zurückgelegten Wegstrecke auf der substratgestützten Membran).

In Figur 3 ist eine zweite Ausführungsform einer substratgestützten Membran zur Erläuterung einer dritten Ausführungsform des Verfahrens zur elektrophoretischen Trennung von Partikeln gemäß der Erfindung dargestellt.

Diese Ausführungsform unterscheidet sich von der in Figur 2 gezeigten substratgestützten Membran dadurch, dass die Oberfläche des Substrats 4 mit Rippen 9 versehen ist. Im Übrigen entspricht die dargestellte Ausführungsform der in Figur 2 dargestellten, weshalb zur Vermeidung von Wiederholungen auf die Diskussion dieser Ausführungsform verwiesen wird.

In der Ausführungsform in Figur 3 wird ein Substrat verwendet, dessen Rippen 9 eine Periodizität in einem Bereich von 2 nm bis 200 nm aufweisen. Die Höhe der Rippen liegt hierbei in einem Bereich von 0.1 nm bis 10 nm.

In einem Substrat aus den oben bezeichneten Kunststoffen kann die Strukturierung beispielsweise durch das Eindrücken eines Stempels, welcher das Negativ der gewünschten Form enthält, gebildet werden. Hierbei wird der Kunststoff zweckmäßigerweise erwärmt. Als Stempel kann ein in der (111) Ebene geschnittener Si-Wafer, der mit KOH angeätzt wurde, verwendet werden.

Durch Verwendung des Substrats 4 mit Rippen 9 wird die Bewegung, insbesondere die Ausrichtung, der Makromoleküle auf einer auf einem derartigen Substrat aufgetragenen Membran im elektrischen Feld in Abhängigkeit von ihrer Größe noch stärker beeinflusst. Insbesondere wird die Reibungskraft bei der Ausrichtung für größere Makromoleküle stärker erhöht als für kleinere Makromoleküle, was insgesamt zu einer weiteren Diskriminierung bezüglich der Größe der Makromoleküle führt.

Zur weiteren Erläuterung der Erfindung werden im Folgenden verschiedene Beispiele, die mit den oben beschriebenen Einrichtungen durchgeführt worden sind, beschrieben.

Beispiel 1:

Präparation einer substratgestützten Membran durch Vesikelfusion

Im Beispiel 1 wurde eine substratgestützte Membran durch Herstellen einer kationischen Doppelschicht aus Lipiden durch Vesikelfusion auf einem Glasträger realisiert. Hierzu wurden beispielsweise in Chloroform gelöste Lipide gemischt. Ein typisches Verhältnis ist DOPC/DOTAP 9/1. Diese Lösung wurde eingetrocknet, und daraufhin wurden die Lipide mit Wasser oder Pufferlösung, beispielsweise HEPES 10mM, NaCl 10mM, EDTA 1mM wieder aufgequollen. Die Lipidkonzentration betrug dabei ungefähr 1mg/ml. Diese Lösung wurde mit einem Rüsselbeschaller 1 bis 2min beschallt. Die zu beschichtende Oberfläche wurde vor dem eigentlichen Vesikelfusionsvorgang so behandelt, dass sie stark hydrophil war. Dazu eignet sich beispielsweise eine einminütige Behandlung mit 5M KOH-Lösung. Zum Füllen einer Kammer, wie sie zuvor beschrieben worden ist, wurden ca. 2ml der Vesikellösung in die Kammer gegeben. Nach ungefähr 2h wurde die Kammer mit der Pufferlösung gut gespült, um den Lipidüberschuss zu entfernen. In der Kammer verblieb nach diesem Vorgang eine Doppelschicht mit einer Dicke von ungefähr 4nm. Zwischen der Doppelschicht und dem Substrat bildete sich eine etwa 0.1nm dicke Wasserschicht aus. In diesem Beispiel hatte die Membran eine laterale Selbstdiffusionskonstante von ca. $1\mu\text{m}^2/\text{s}$.

Da die elektrophoretische Trennung in dem vorliegenden Beispiel mit hochauflösender Mikroskopie ausgewertet werden sollte, wurde ein transparentes optisch inertes Substrat bzw. Kammerboden verwendet, dessen Dicke zwischen 100 und 200 μm lag.

Trennung der DNA durch gepulste Felder

Die zu trennenden Makromoleküle, beispielsweise DNA 80 bp (Basenpaare) und 40 bp wurden ebenfalls in die Kammer gegeben.

Doppelsträngige DNA der Länge 80 bp zeigten im vorliegenden Beispiel auf der fluiden Membran eine Selbstdiffusionskonstante von $0.2\mu\text{m}^2/\text{s}$, 40 bp lange DNA dagegen eine Diffusionskonstante von $0.4\mu\text{m}^2/\text{s}$.

Durch das Anlegen eines gepulsten Feldes zwischen 0.1V/cm und 100V/cm trennen sich die DNA-Makromoleküle. Dabei wurde ausgenutzt, dass sich die DNA-Oligomere durch Eigenrotationsdiffusion bei jedem Abschalten des Feldes wieder zufällig orientieren. Diese Tatsache bricht das Proportionalitätsverhältnis zwischen DNA-Basenpaaranzahl und Beweglichkeit.

Um Polarisierungen der Elektroden zu vermeiden, wurden geschwärzte Platinelektroden oder Ag/AgCl Elektroden verwendet. Je nach Kammergröße, Salzgehalt der Pufferlösung und angelegter Spannung fließt ein Strom zwischen 0.1 μA und 10 mA. Das E-Feld wurde ca. 10 min angelegt.

Sichtbarmachung der DNA Banden durch Fluoreszenzmarkierung

Durch die Zugabe von DNA Farbstoffen, beispielsweise TOTO in einem Verhältnis von einem Toto-Makromolekül auf fünf DNA Basenpaare, ist die DNA nach ca. 10 min bei Raumtemperatur fluoreszenzmarkiert. Dazu wird Wasser/Puffer mit der entsprechenden Menge TOTO in die Kammer gespült. Zur Beobachtung der Banden wurde ein

Axiovert 100 der Firma Carl Zeiss verwendet. Es zeigten sich die zwei Banden der 40 bp und 80 bp langen Oligomere.

Beispiel 2:Präparation einer kationischen Monoschicht oder Doppelschicht durch Langmuir-Blodgett-Technik

Durch die Langmuir-Blodgett-Technik wurde eine fluide Membran auf PMMA aufgebracht; anstelle von PMMA wurden auch PC, PE, PS, PVC sowie zyklische Olefine verwendet. Bei der Langmuir-Blodgett-Technik werden in Chloroform gelöste amphiphile Moleküle an der Wasseroberfläche eines Teflontroges gespreitet, so dass der hydrophile Molekülbereich in das Wasser eindringt und der hydrophobe Anteil aus dem Wasser herausragt. Diesen Film kann man mittels einer geeigneten Barriere auf den gewünschten lateralen Druck komprimieren. Taucht man nun ein vertikal ausgerichtetes Plättchen aus den oben genannten Materialien durch diesen Film ins Wasser ein, bildet sich eine fluide Monoschicht auf der Plättchenoberfläche.

Mit dieser substratgestützten Membran wurden dieselben Versuche wie in Beispiel 1 durchgeführt und dieselben Ergebnisse erhalten.

Beispiel 3:

Es wurde eine substratgestützte Membran gemäß Beispiel 1 oder gemäß Beispiel 2 hergestellt.

Trennung der DNA durch Kreuzfelder

Im Gegensatz zum ersten und zweiten Beispiel wurde zur Trennung der DNA 80 bp und DNA 40 bp, jedoch kein gepulstes Feld verwendet, sondern gekreuzte Felder, d.h. ein konstantes Feld überlagert von einem Wechselfeld, angelegt.

Dabei hatte das konstante Feld eine Feldstärke zwischen 2 bis 200 V/cm, das Wechselfeld eine Feldstärke zwischen 2-200 V/cm bei einer Frequenz von 0.1 bis 100 Hz. Hierzu wurden Platinum/Platinum Black oder alternativ Ag/AgCl Elektroden verwendet.

Mit dieser substratgestützten Membran wurden dieselben Versuche wie in Beispiel 1 durchgeführt und dieselben Ergebnisse erhalten.

Beispiel 4:

Es wurde eine substratgestützte Membran gemäß Beispiel 1 oder gemäß Beispiel 2 hergestellt.

Trennung der DNA durch Substratstrukturierung

Die Membran wird auf ein zuvor strukturiertes Substrat, wie es beispielsweise in Figur 3 gezeigt ist und im Zusammenhang mit dieser Figur beschrieben ist, aufgebracht. Dieses Substrat hatte Rippel mit ca. 0,1 nm Höhe und 100 nm Periodizität. Weiterhin waren die verwendeten Substrate transparent und hatten eine Dicke von 100 µm bis 200 µm. Die Elektrodenanordnung wurde wie in Beispiel 3 angesteuert.

Die mit dieser Anordnung erhaltenen Ergebnisse entsprechen dem in Beispiel 3 erhaltenen Ergebnis, wobei der relative Abstand der Banden zueinander größer war.

Beispiel 5:

Sammeln der DNS auf einer Linie durch Schaffung nicht fluider Bereiche

Teile des Kammerbodens wurden mit Materialien beschichtet, auf welcher die, wie in den Beispielen 1 bis 4 beschrieben, aufgebrachte Membran nicht fluide ist. Hierzu wurden beispielsweise Al_2O_3 P oder PMMA verwendet. Diese Bereiche bilden für die auf

der Membran beweglichen DNA-Makromoleküle eine Sperrschicht. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes, welches die DNA in Richtung dieser Sperrschicht bewegt, können diese an der Grenze zwischen Membran und Sperrschicht gesammelt werden.

Mit dieser Membran wurden eine elektrophoretische Trennung wie in Beispiel 1 durchgeführt. Im Ergebnis zeigten sich schärfere Banden, also Banden, deren Ausdehnung in Feldrichtung geringer als die der in Beispiel 1 erhaltenen Banden war.

Beispiel 6:

Sammeln der DNS auf einer Linie durch Schaffung nicht von der Membran benetzter Bereiche

Durch Aufbringen von Al_2O_3 auf einen vorbestimmten Bereich des Kammerbodens mit einer Höhe von 10 nm bis 1 μm und einer Breite von 1- 30 μm , wurde vermieden, dass sich in diesem Bereich eine Membran ausbildet. Hiermit wurden die gleichen Versuche wie in Beispiel 1 durchgeführt und die gleichen Ergebnisse wie in Beispiel 5, also schärfere Banden erhalten.

Patentansprüche

1. Verfahren zur elektrophoretischen Trennung von Partikeln, insbesondere von membranständigen Makromolekülen, mit den Schritten:

Aufbringen der zu trennenden Partikel auf eine substratgestützte Membran, so dass die Partikel entlang der Oberfläche der substratgestützten Membran beweglich sind,

Vorsehen eines elektrischen Feldes derart, dass die Feldrichtung entlang der Oberfläche, entlang der die Partikel beweglich sind, ausgerichtet ist,

zeitliches Verändern der Stärke oder Richtung elektrischen Feldes und/oder Verwenden einer substratgestützten Membran mit einer strukturierten Oberfläche, wobei die Stärke oder Richtung des elektrischen Feldes zeitlich so verändert wird und/oder die substratgestützte Membran so strukturiert ist, dass auf die Partikel eine Kraft wirkt, die zu einer von der Länge der Partikel abhängigen Bewegung führt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, in welchem als substratgestützte Membran eine fluide Lipidmembran, insbesondere aus PEG funktionalisierten Lipiden und/oder aus DAC-Chol-Lipiden verwendet wird.
3. Verfahren nach Anspruch 2, in welchem eine kationische fluide Lipidmembran verwendet wird.
4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, in welchem eine fluide Membran verwendet wird, die amphiphile Makromoleküle aufweist.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 4, in welchem eine fluide Lipidmembran verwendet wird, die Doppelschichten aus geladenen Lipiden aufweist.

6. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, in welchem ein gepulstes elektrisches Feld verwendet wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, in welchem ein Wechselfeld verwendet wird, dem ein zeitlich konstantes Feld überlagert ist.
8. Verfahren nach Anspruch 7, in welchem das Wechselfeld und das zeitlich konstante Feld kreuzartig überlagert werden.
9. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, in welchem zur Stützung der Membran ein Substrat verwendet wird, dessen Oberfläche Rippen aufweist.
10. Verfahren nach Anspruch 9, in welchem ein Substrat verwendet wird, das eine Periodizität in einem Bereich von 2nm bis 200nm aufweist.
11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, in welchem ein Substrat verwendet wird, das eine Höhe der Rippen in einem Bereich von 0.1nm bis 10nm aufweist.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 11, in welchem ein zeitlich konstantes Feld, dessen Richtung im Wesentlichen parallel zu den Rippen verläuft, verwendet wird.
13. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, in welchem die Bewegung eine Drehung ist.
14. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, in welchem die Membran einen Sperrbereich, in den keine Bewegung der Partikel möglich ist, aufweist, und vor Durchführung der Elektrophorese die Partikel durch Anlegen eines elektrischen Feldes an diesem Sperrbereich gesammelt werden.

15. Verfahren nach Anspruch 14 in Verbindung mit einem der Ansprüche 2 bis 5, in welchem der Sperrbereich durch einen nicht fluiden Bereich der fluiden Membran realisiert wird.
16. Verfahren zur Beobachtung einer elektrophoretischen Trennung, in welchem eine elektrophoretische Trennung nach einem der vorangegangenen Ansprüche durchgeführt wird, von der elektrophoretischen Trennung digitalisierte Bilddaten aufgezeichnet werden, und die aufgezeichneten Bilddaten computergestützt ausgewertet werden.
17. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, in welchem die zu trennenden Partikel DNA, RNA, DNA-, RNA-Oligomere und/oder Proteine aufweisen.
18. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, in welchem die Partikel in einem pH-Gradienten wandern.
19. Verfahren nach Anspruch 18, in welchem der pH-Gradient parallel zum elektrischen Feld vorgesehen ist.
20. Verfahren nach Anspruch 18 oder 19, in welchem der pH-Gradient senkrecht zum elektrischen Feld vorgesehen ist.
21. Substrat (4), insbesondere zur Stützung einer Membran bei der Durchführung eines Verfahrens gemäß einem der vorangegangenen Ansprüche, aus optisch transparentem Material.
22. Substrat nach Anspruch 21, das als optisch transparentes Material Glas aufweist.
23. Substrat nach Anspruch 21, das als optisch transparentes Material Kunststoff aufweist.

24. Substrat nach Anspruch 23, in welchem der Kunststoff PC, PMMA, PS, PE oder Plastik aus zyklischen Olefinen aufweist.
25. Substrat nach einem der Ansprüche 21 bis 24, dessen Oberfläche strukturiert ist.
26. Substrat nach Anspruch 25, dessen Oberfläche Rippen (9) aufweist.
27. Substrat nach Anspruch 26, in welchem die Rippen eine Periodizität in einem Bereich von 2nm bis 200nm aufweisen.
28. Substrat nach Anspruch 26 oder 27, in welcher die Rippen eine Höhe in einem Bereich von 0.1nm bis 10nm aufweisen.
29. Substratgestützte Membran, insbesondere zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 20, mit

einem Substrat nach einem der Ansprüche 21 bis 28, und

einer fluiden Lipidmembran.
30. Substratgestützte Membran nach Anspruch 29, in welcher die fluide Lipidmembran kationische Lipide aufweist.
31. Substratgestützte Membran nach Anspruch 29 oder 30, in welcher die fluide Lipidmembran amphiphile Makromoleküle aufweist.
32. Substratgestützte Membran nach einem der Ansprüche 29 bis 31, in welcher die fluide Lipidmembran Doppelschichten aus geladenen Lipiden aufweist.

33. Substratgestützte Membran nach einem der Ansprüche 29 bis 32, in welcher die fluide Lipidmembran eingetrocknet ist.
34. Substratgestützte Membran nach einem der Ansprüche 29 bis 33, in welcher die fluide Membran wenigstens einen nicht fluiden Bereich aufweist.
35. Mikrokanalelektrophoresekammer (1) mit

wenigstens einem Kanal (3), dessen Bodenfläche ein Substrat (4) nach einem der Ansprüche 18 bis 25 aufweist, und

einer Elektrodenanordnung (6; 6a, 6b).
36. Mikrokanalelektrophoresekammer nach Anspruch 35, in welcher jeder Kanal eine Breite in einem Bereich von 1µm bis 10mm aufweist.
37. Mikrokanalelektrophoresekammer nach Anspruch 35 bis 36, in welcher jeder Kanal eine Tiefe in einem Bereich von 10 nm bis 20µm aufweist.
38. Mikrokanalelektrophoresekammer nach einem der Ansprüche 35 bis 37, in welcher eine Mehrzahl von Kanälen vorgesehen sind, die in Form einer zweidimensionalen Matrix angeordnet sind.
39. Mikrokanalelektrophoresekammer nach einem der Ansprüche 35 bis 36, in welcher die Elektrodenanordnung zwei jeweils an den Längsenden eines jeden Kanals vorgesehene Elektroden aufweist.
40. Mikrokanalelektrophoresekammer nach einem der Ansprüche 35 bis 39, in welcher die Elektrodenanordnung zwei Elektroden aufweist, die sich zu beiden Seiten eines jeden Kanals in Kanallängsrichtung erstrecken.

41. Mikrokanalelektrophoresekommer nach einem der Ansprüche 35 bis 40, in welcher das Substrat mit einer fluiden Lipidmembran beschichtet ist.
42. Mikrokanalelektrophoresekommer nach Anspruch 41, in welcher die fluide Lipidmembran kationische Lipide aufweist.
43. Mikrokanalelektrophoresekommer nach Anspruch 41 oder 42, in welcher die fluide Lipidmembran amphiphile Makromoleküle aufweist.
44. Mikrokanalelektrophoresekommer nach einem der Ansprüche 41 bis 43, in welcher die fluide Lipidmembran Doppelschichten aus geladenen Lipiden aufweist.
45. Mikrokanalelektrophoresekommer nach einem der Ansprüche 41 bis 44, in welcher die fluide Lipidmembran eingetrocknet ist.
46. Mikrokanalelektrophoresekommer nach einem der Ansprüche 41 bis 45, in welcher die fluide Membran wenigstens einen nicht fluiden Bereich aufweist.

1/3

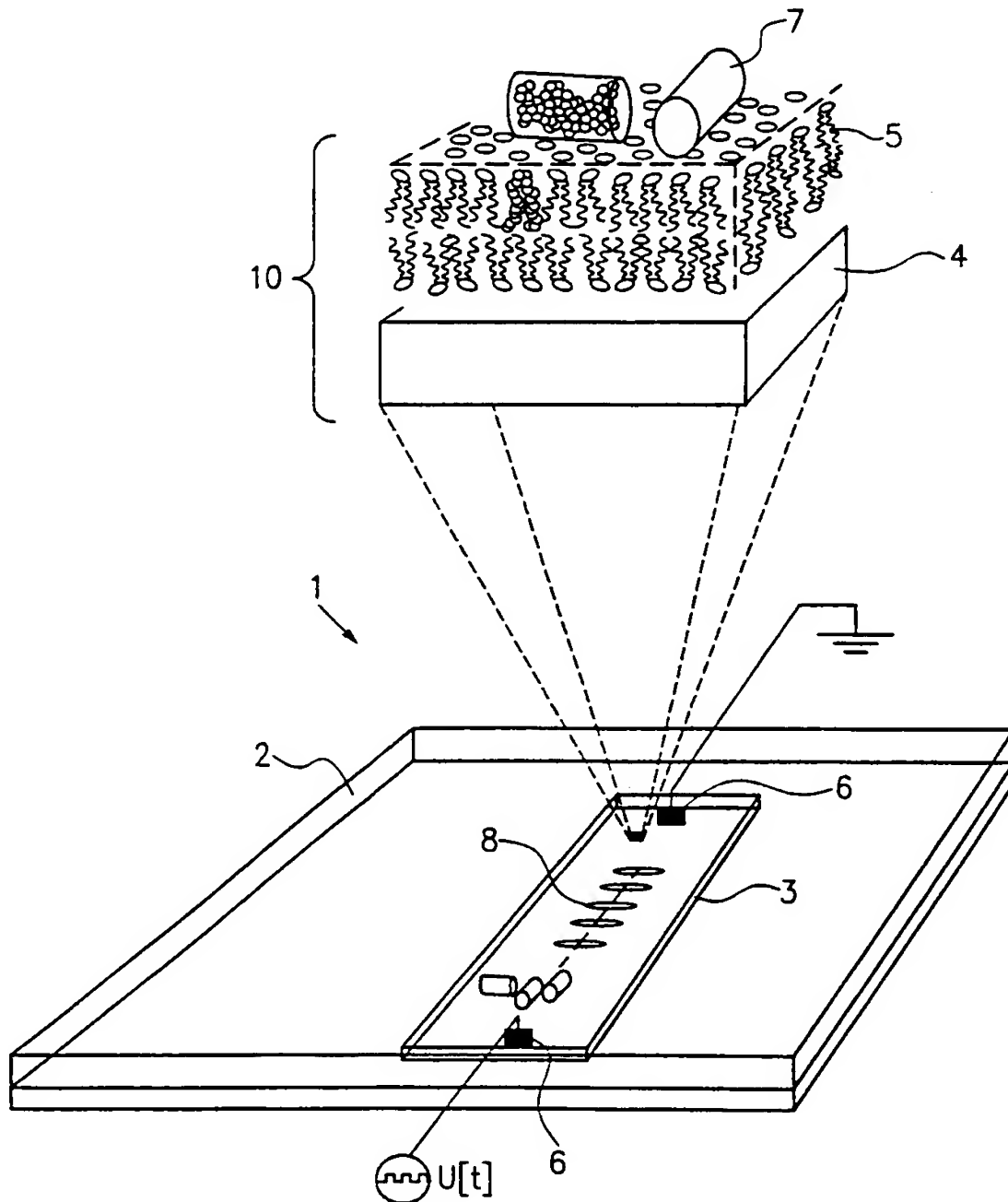


FIG. 1



2/3

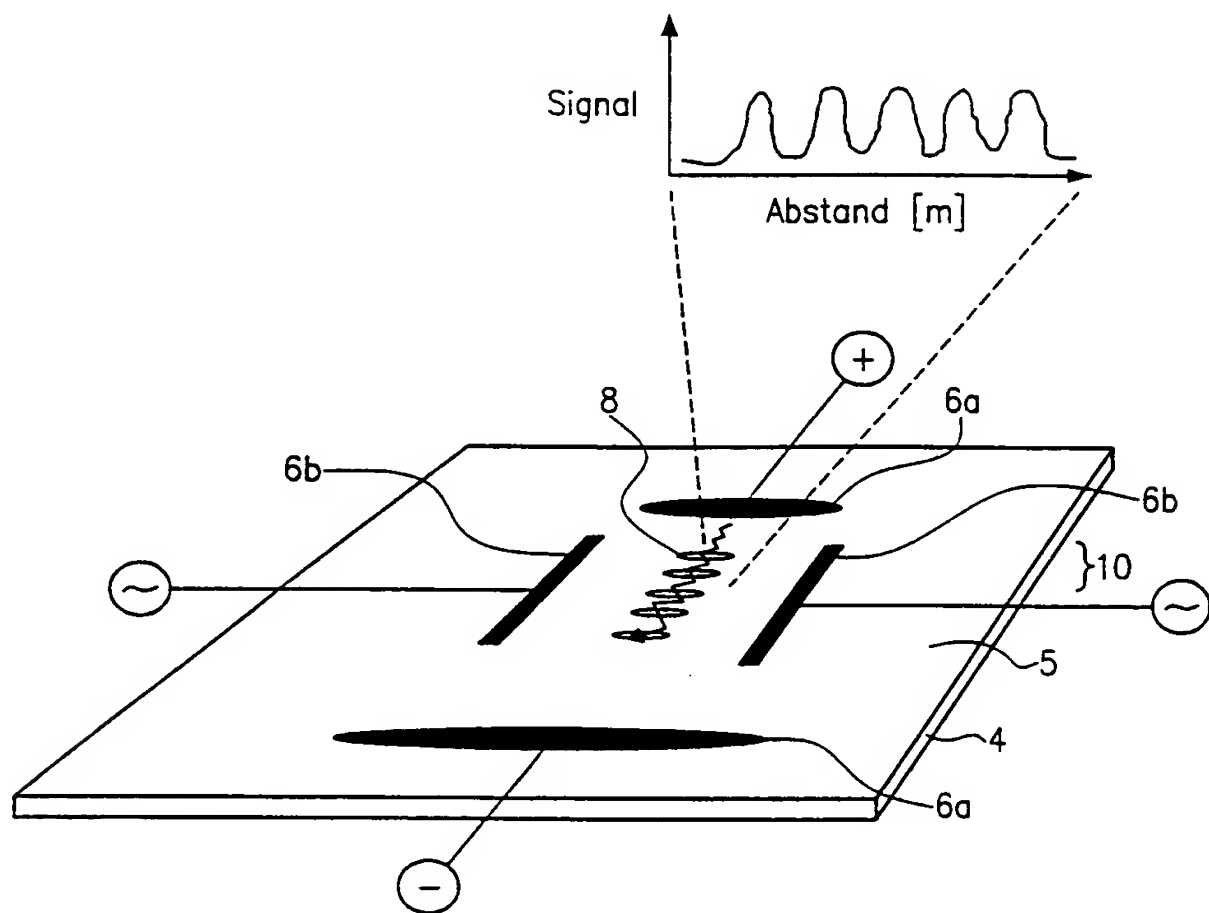


FIG. 2



3/3

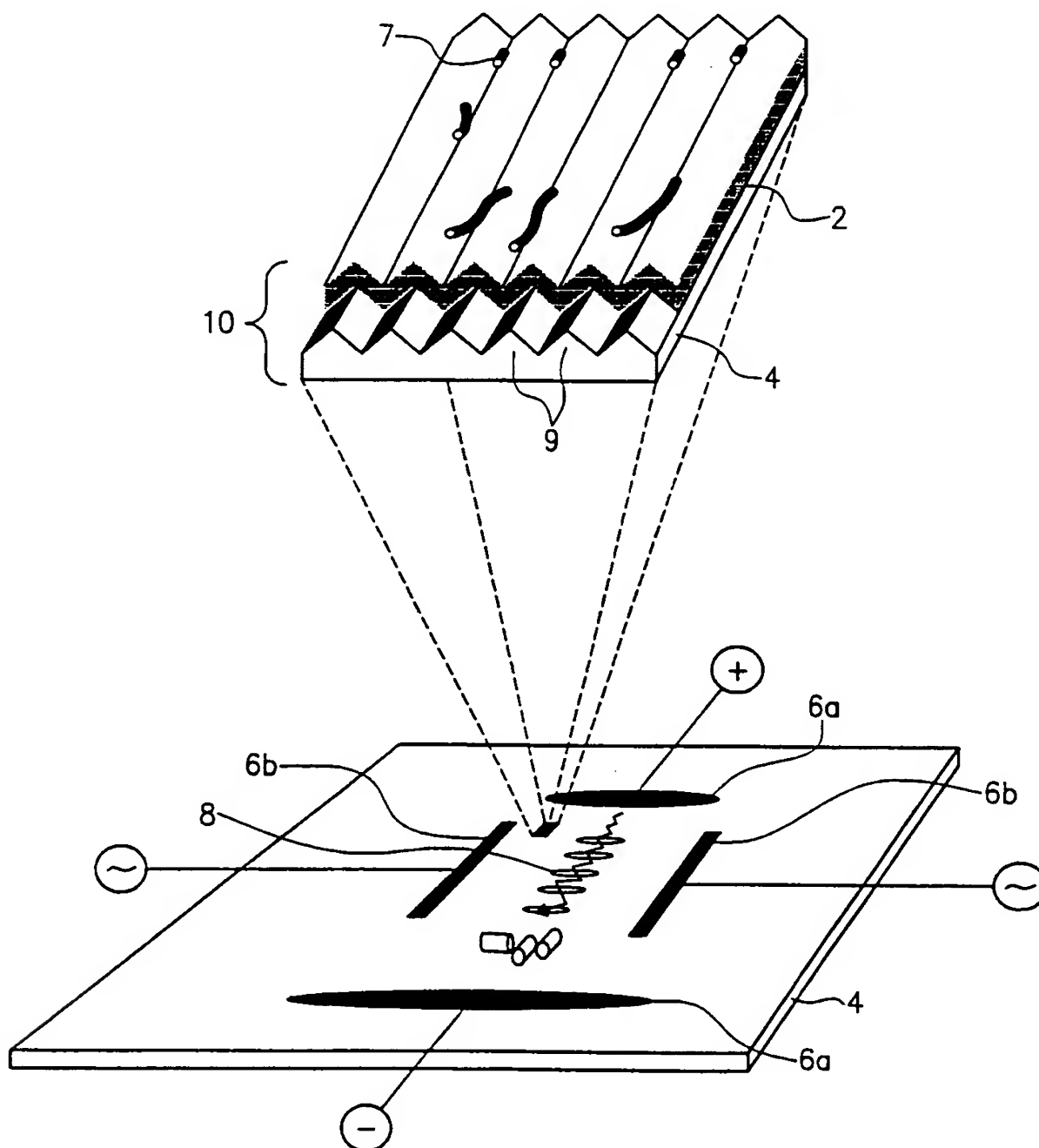


FIG. 3



(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
1. Februar 2001 (01.02.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/07150 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 27/447

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/07206

(22) Internationales Anmeldedatum:
26. Juli 2000 (26.07.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 35 028.0 26. Juli 1999 (26.07.1999) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: KAHL, Johan-Valentin [DE/DE]; Amalien-
strasse 49a, 80799 München (DE). NISSEN, Julia
[DE/DE]; Peissenbergstr. 4, 81547 München (DE).
RÄDLER, Joachim [DE/DE]; Römerhofweg 51, 85748
Garching (DE). ZANTL, Roman [DE/DE]; Odeonsplatz
2, 80539 München (DE). MAIER, Berenike [DE/DE];
Rathausstrasse 34, 85757 Karlsfeld (DE). RÄDLER, Ulf
[DE/DE]; Marchgrabenplatz 1a, 80805 München (DE).

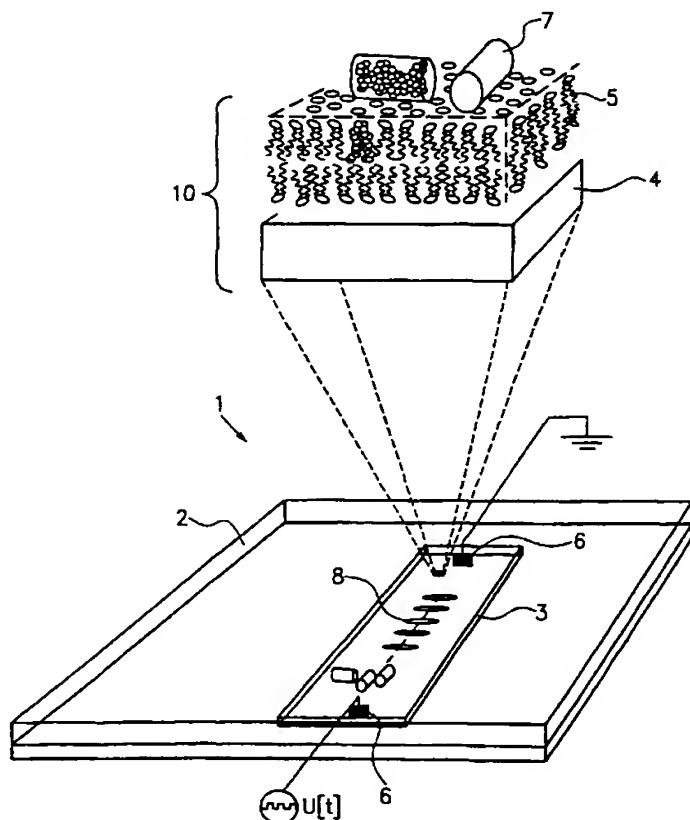
(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HOHNER, Andreas
[DE/DE]; Leberblümchenstr. 18, 80995 München (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR THE ELECTROPHORETIC SEPARATION OF PARTICLES, ESPECIALLY OF
MACROMOLECULES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNGEN ZUR ELEKTROPHORETISCHEN TRENNUNG VON
PARTIKELN, INSBESONDERE VON MAKROMOLEKÜLEN



(57) Abstract: The invention relates to a method for the electrophoretic separation of particles, especially of macromolecules. The inventive method comprises the following steps: applying the particles to be separated on a substrate-supported membrane so that the particles are mobile across the surface of the substrate-supported membrane, supplying an electrical field in such a manner that electrical fields are formed across the surfaces across which the particles are mobile, temporarily modifying the electrical fields and/or using a substrate-supported membrane with a structured surface, the direction and strength of the electrical field being temporarily modified such and/or the substrate-supported membrane being structured such that a force is acting on the particles that leads to a movement that depends on the length of the particles. The invention further provides a substrate especially for supporting a membrane that consists of an optically transparent material and that is used in the inventive method. The invention is also characterized by a substrate-supported membrane for carrying out the inventive method with an inventive substrate according to any of the claims, and a fluid lipid membrane. The invention provides a micro-channel electrophoresis chamber with at least one channel the bottom of which comprises an inventive substrate and with an electrode system.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 01/07150 A3

GALNEDER, Reinhard [DE/DE]; Guerickestr. 19,
80805 München (DE).

(74) **Anwalt:** GRÜNECKER, KINKELDEY, STOCKMAIR
& SCHWANHÄUSSER; Maximilianstrasse 58, 80538
München (DE).

(81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DK,
DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT,
RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),

europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) **Veröffentlichungsdatum des internationalen**

Recherchenberichts:

26. Juli 2001

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.*

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung zeichnet sich aus durch ein Verfahren zur elektrophoretischen Trennung von Partikeln, insbesondere von Makromolekülen, mit den Schritten eines Aufbringens der zu trennenden Partikel in eine substratgestützte Membran, so dass die Partikel entlang der Oberfläche der substratgestützten Membran beweglich sind, eines Vorsehens eines elektrischen Feldes, derart dass entlang der Oberfläche, entlang der die Partikel beweglich sind, E-Felder ausgebildet werden, und eines zeitlichen Veränderns des elektrischen Feldes und/oder eines Verwendens einer substratgestützten Membran mit einer strukturierten Oberfläche, wobei Richtung und Stärke des elektrischen Feldes zeitlich so verändert werden und/oder die Substratgestützte Membran so strukturiert ist, dass auf die Partikel eine Kraft wirkt, die zu einer von der Länge der Partikel abhängigen Bewegung führt. Weiterhin schafft die Erfindung ein Substrat, insbesondere zur Stützung einer Membran bei der Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens aus optisch transparentem Material. Darüber hinaus zeichnet sich die Erfindung durch eine substratgestützte Membran zur Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens mit einem erfindungsgemässen Substrat nach einem der Ansprüche, und einer fluiden Lipidmembran aus. Ausserdem schafft die Erfindung eine Mikrokanalelektrophoresekammer mit wenigstens einem Kanal, dessen Bodenfläche ein erfindungsgemässes Substrat aufweist, und mit einer Elektrodenanordnung.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/07206

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N27/447

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5 427 663 A (AUSTIN ROBERT H ET AL) 27 June 1995 (1995-06-27) column 9, line 18 -column 10, line 51; figures 2,3	1,21,29, 35
Y	EP 0 396 053 A (ISCO INC) 7 November 1990 (1990-11-07) page 8, line 9 - line 28; figure 1	1,21,29, 35
A	WO 96 42012 A (MARUZZO BRUNO ;STEVENS JOHN K (CA); WATERHOUSE PAUL (CA); YAGER TH) 27 December 1996 (1996-12-27) abstract; figures 1A-1C	1
A	US 5 630 924 A (NASHABEH WASSIM A ET AL) 20 May 1997 (1997-05-20) column 21, line 45 - line 48	2
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents .

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 January 2001

Date of mailing of the international search report

06/02/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Duchatellier, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 00/07206

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 066 382 A (WEINBERGER SCOT R ET AL) 19 November 1991 (1991-11-19) column 12, line 38 - line 51 ---	2-4
A	US 5 059 294 A (LIZARDI PAUL M) 22 October 1991 (1991-10-22) column 9, line 39 - line 58; figures 2,3 ---	7,8
A	US 5 423 966 A (WIKTOROWICZ JOHN) 13 June 1995 (1995-06-13) abstract ---	14,15
A	WO 96 23213 A (MURRAY ANTHONY J ;STEGEMANN JOSEF (DE); ANSORGE WILHELM (DE)) 1 August 1996 (1996-08-01) abstract ---	16
A	US 5 846 394 A (SMOLENSKY LEO A ET AL) 8 December 1998 (1998-12-08) abstract -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/07206

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5427663	A	27-06-1995	CA 2164720 A EP 0711412 A JP 9504362 T WO 9429707 A US 5837115 A	22-12-1994 15-05-1996 28-04-1997 22-12-1994 17-11-1998
EP 0396053	A	07-11-1990	US 5135628 A US 5336383 A CA 2016107 A JP 3041356 A	04-08-1992 09-08-1994 05-11-1990 21-02-1991
WO 9642012	A	27-12-1996	AU 698921 B AU 6271896 A AU 702083 B AU 6274696 A CA 2222628 A CA 2226405 A EP 0830594 A EP 0830595 A JP 11508042 T WO 9642013 A US 6110339 A	12-11-1998 09-01-1997 11-02-1999 09-01-1997 27-12-1996 27-12-1996 25-03-1998 25-03-1998 13-07-1999 27-12-1996 29-08-2000
US 5630924	A	20-05-1997	EP 0821791 A JP 3035357 B JP 10512371 T WO 9633412 A US 5948231 A	04-02-1998 24-04-2000 24-11-1998 24-10-1996 07-09-1999
US 5066382	A	19-11-1991	NONE	
US 5059294	A	22-10-1991	NONE	
US 5423966	A	13-06-1995	AT 181156 T AU 694657 B AU 5615596 A CA 2181136 A DE 69510185 D DE 69510185 T EP 0746763 A JP 9508211 T WO 9520156 A US 5593559 A	15-06-1999 23-07-1998 15-01-1998 27-07-1995 15-07-1999 02-12-1999 11-12-1996 19-08-1997 27-07-1995 14-01-1997
WO 9623213	A	01-08-1996	EP 0805974 A JP 10513553 T	12-11-1997 22-12-1998
US 5846394	A	08-12-1998	NONE	



A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N27/447

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehorende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	US 5 427 663 A (AUSTIN ROBERT H ET AL) 27. Juni 1995 (1995-06-27) Spalte 9, Zeile 18 - Spalte 10, Zeile 51; Abbildungen 2,3 ---	1,21,29, 35
Y	EP 0 396 053 A (ISCO INC) 7. November 1990 (1990-11-07) Seite 8, Zeile 9 - Zeile 28; Abbildung 1 ---	1,21,29, 35
A	WO 96 42012 A (MARUZZO BRUNO ; STEVENS JOHN K (CA); WATERHOUSE PAUL (CA); YAGER TH) 27. Dezember 1996 (1996-12-27) Zusammenfassung; Abbildungen 1A-1C ---	1
A	US 5 630 924 A (NASHABEH WASSIM A ET AL) 20. Mai 1997 (1997-05-20) Spalte 21, Zeile 45 - Zeile 48 ---	2
	--- -/-	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

31. Januar 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

06/02/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Duchatellier, M

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 5 066 382 A (WEINBERGER SCOT R ET AL) 19. November 1991 (1991-11-19) Spalte 12, Zeile 38 - Zeile 51 ---	2-4
A	US 5 059 294 A (LIZARDI PAUL M) 22. Oktober 1991 (1991-10-22) Spalte 9, Zeile 39 - Zeile 58; Abbildungen 2,3 ---	7,8
A	US 5 423 966 A (WIKTOROWICZ JOHN) 13. Juni 1995 (1995-06-13) Zusammenfassung ---	14,15
A	WO 96 23213 A (MURRAY ANTHONY J ; STEGEMANN JOSEF (DE); ANSORGE WILHELM (DE)) 1. August 1996 (1996-08-01) Zusammenfassung ---	16
A	US 5 846 394 A (SMOLENSKY LEO A ET AL) 8. Dezember 1998 (1998-12-08) Zusammenfassung -----	1

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/07206

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5427663 A	27-06-1995	CA 2164720 A	22-12-1994
		EP 0711412 A	15-05-1996
		JP 9504362 T	28-04-1997
		WO 9429707 A	22-12-1994
		US 5837115 A	17-11-1998
EP 0396053 A	07-11-1990	US 5135628 A	04-08-1992
		US 5336383 A	09-08-1994
		CA 2016107 A	05-11-1990
		JP 3041356 A	21-02-1991
WO 9642012 A	27-12-1996	AU 698921 B	12-11-1998
		AU 6271896 A	09-01-1997
		AU 702083 B	11-02-1999
		AU 6274696 A	09-01-1997
		CA 2222628 A	27-12-1996
		CA 2226405 A	27-12-1996
		EP 0830594 A	25-03-1998
		EP 0830595 A	25-03-1998
		JP 11508042 T	13-07-1999
		WO 9642013 A	27-12-1996
		US 6110339 A	29-08-2000
US 5630924 A	20-05-1997	EP 0821791 A	04-02-1998
		JP 3035357 B	24-04-2000
		JP 10512371 T	24-11-1998
		WO 9633412 A	24-10-1996
		US 5948231 A	07-09-1999
US 5066382 A	19-11-1991	KEINE	
US 5059294 A	22-10-1991	KEINE	
US 5423966 A	13-06-1995	AT 181156 T	15-06-1999
		AU 694657 B	23-07-1998
		AU 5615596 A	15-01-1998
		CA 2181136 A	27-07-1995
		DE 69510185 D	15-07-1999
		DE 69510185 T	02-12-1999
		EP 0746763 A	11-12-1996
		JP 9508211 T	19-08-1997
		WO 9520156 A	27-07-1995
		US 5593559 A	14-01-1997
WO 9623213 A	01-08-1996	EP 0805974 A	12-11-1997
		JP 10513553 T	22-12-1998
US 5846394 A	08-12-1998	KEINE	

